

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

Nucleic acid constructs suitable for expressing a foreign gene in a host cell have the following components: (a) at least part of a promoter which corresponds to a host-related, constitutive active promoter; (b) at least one binding site for a transcription factor; (c) at least one transgene; and (d) at least one gene coding for a transcription factor that can bond to the binding site for a transcription factor (b).

(57) Zusammenfassung

Offenbart werden Nucleinsäurekonstrukte, die zur Expression eines Fremdgens in einer Wirtszelle geeignet sind und die folgende Komponenten aufweisen: (a) wenigstens einen Teil eines Promotors, der einem wirts-verwandten, konstitutiv aktiven Promotor entspricht; (b) wenigstens eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor; (c) wenigstens ein Transgen und (d) wenigstens ein Gen kodierend für einen Transkriptionsfaktor, der an die Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor (b) binden kann.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Nucleinsäurekonstrukte zur lang andauernden Expression von Transgenen

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte werden für die Expression von Transgenen in Wirtszellen verwendet. Durch die Gentechnologie ist es möglich, bestimmte Gene von einem Spender in Empfängerzellen zu übertragen. Dieses übertragene Gen (Transgen) wird dann in der Wirtszelle exprimiert. Insbesondere bei höheren Organismen (Eukaryonten) beinhaltet die Regulation der Expression erhebliche Schwierigkeiten. Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäurekonstrukte, insbesondere Vektoren, die eine permanente, lang andauernde Expression von Transgenen in transformierten Zellen ermöglichen.

Hofmann et al. (Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol. 93 (Mai 1996), S. 5185-5190) beschreiben eine autoregulatorische Kasette, die die reversible Induktion der Transgen-Expression in Abhängigkeit von Tetracyclin ermöglicht. Das von Hofmann et al. beschriebene Nucleinsäurekonstrukt verwendet als Promotor einen minimalen Promotor, der vom Cytomegalievirus stammt. In seiner natürlichen Form steuert dieser Promotor die Expression der sehr frühen Proteine von Cytomegalievirus (CMV Immediate Early Minimal Promotor).

- 2 -

Häufig wird die Expression von Fremdgenen in eukaryontischen Zellen durch virale Promotoren gesteuert, da sich die sogenannten "long terminal repeat elements" von Retroviren, oder der "immediate/early promotor" des Cytomegalievirus als sehr wirksame Promotoren herausgestellt haben.

Es hat sich allerdings herausgestellt, daß virale Promotoren keine lang andauernde Expression von Transgenen ermöglichen, da diese Promotoren von der Wirtszelle verhältnismäßig schnell "abgeschaltet" werden. Dies kann möglicherweise durch Hypermethylierung der Promotorregion erfolgen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Nucleinsäurekonstrukt zur Verfügung zu stellen, das in eukaryotischen Zellen eine lang andauernde, ausreichende Expression von Transgenen ermöglicht, die in bevorzugter Ausführungsform regulierbar ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Nucleinsäurekonstrukte, die zur Expression eines Fremdgens in einer Wirtszelle geeignet ist, die folgende Komponenten aufweisen:

- (a) wenigstens einen Teil eines Promotors, der einem wirtsverwandten, konstitutiv aktiven Promotor entspricht,
- (b) wenigstens eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor,
- (c) wenigstens ein Transgen und
- (d) wenigstens ein Gen kodierend für einen Transkriptionsfaktor, der an die Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor (b) binden kann.

- 3 -

Unter dem Begriff "Nucleinsäurekonstrukt" wird eine Anordnung von verschiedenen Komponenten verstanden, die aus Nucleinsäure, insbesondere aus DNA bestehen. Die Komponenten der erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte wirken funktionell aufeinander ein und ermöglichen die Expression eines Transgenes unter kontrollierten Bedingungen. Die einzelnen Komponenten der erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte können sich bevorzugt auf einem Nucleinsäurekonstrukt befinden oder sie können auf zwei oder mehreren Konstrukten verteilt sein. Voraussetzung ist allerdings, daß sich im letztgenannten Fall die einzelnen Nucleinsäurekonstrukte in einer Zelle befinden.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte werden zur Expression eines Fremdgens in einer Wirtszelle verwendet. Unter dem Begriff "Fremdgen" oder auch "Transgen" wird im Sinne der vorliegenden Erfindung ein Gen verstanden, das für ein Genprodukt kodiert, das nach seiner Expression bestimmte Wirkungen verursacht. Bevorzugt handelt es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung bei den Transgenen um solche Gene, die für Cytokine kodieren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff Cytokine eine Gruppe von immunomodulatorischen Proteinen, die auch Immunotransmitter genannt werden. Die Cytokine agieren als humorale Regulatoren, die die funktionellen Aktivitäten bestimmter Zellen regeln. Der Begriff "Cytokine" umfaßt die Interleukine, Interferone und koloniestimulierenden Faktoren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind die koloniestimulierenden Faktoren, insbesondere G-CSF (Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor) besonders bevorzugt.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukten wird die Expression dadurch erhöht, daß an geeigneter Stelle in dem Promotor wenigstens eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor eingebaut wird. Das für den Transkriptionsfaktor kodierende Gen ist stromabwärts des Promotors angeordnet und wird von diesem gesteuert. Die

Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor, die erfindungsgemäß in den Promotor eingebaut wird, stammt dabei bevorzugt von einer anderen Genanordnung und tritt daher nicht in dem entsprechenden natürlich vorkommenden Promotor auf.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte enthalten als Besonderheit innerhalb eines konstitutiv aktiven Promotors eine Bindungssequenz für einen Transkriptionsfaktor sowie das Gen desselben Transkriptionsfaktors am 3'-Ende des Konstruktes. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Konstrukte wird die Translation des Gens dieses Transkriptionsfaktors durch geeignete Fusion mit der "internal ribosome entry sequence" des Encephalomyocarditisvirus ermöglicht. In einem solchen Konstrukt wird die Expression des Transgens und des Transkriptionsfaktors vom gleichen Promotor gesteuert. Ein solches Konstrukt wird daher auch als "dicistronisch" bezeichnet. Durch den Einbau der Bindungssequenz für den Transkriptionsfaktor in den Promotor wirkt in der erfindungsgemäßen Anordnung daher die Expression des Transkriptionsfaktors rückkoppelnd verstärkend auf seine eigene Expression sowie auf die Expression des Transgens. Erfindungsgemäß wird durch diesen Mechanismus die konstitutiv aktive Funktion des Promotors deutlich verstärkt.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte sind, was die Expression angeht, in bevorzugter Ausführungsform regulierbar. Derartige Nucleinsäurekonstrukte weisen folgende Komponenten auf:

- (a) wenigstens einen Teil eines Promotors, der einem wirtsverwandten Promotor entspricht,
- (b) wenigstens eine Bindungsstelle für einen Repressor,
- (c) wenigstens ein Transgen und

- 5 -

- (d) ein chimäres Gen kodierend für einen Repressor, der an die Bindungsstelle für einen Repressor (b) binden kann, fusioniert mit wenigstens einem Teil eines Transaktivierungsfaktors.

An den funktionellen Teil des Promotors ist dann eine Bindungsstelle für einen Repressor gekoppelt. Diese Bindungsstelle kann sich bevorzugt innerhalb des Promotors befinden. Weiterhin beinhaltet das Nucleinsäurekonstrukt ein chimäres Gen, das für einen Repressor, der an die Bindungsstelle für den Repressor binden kann, kodiert. Weiterhin beinhaltet das chimäre Gen ein Gen für einen Transaktivierungsfaktor. Wenn das Substrat, für das der Repressor spezifisch ist, vorhanden ist, bindet das chimäre Genprodukt mit dem Substrat und dadurch wird eine Bindung an die Bindungsstelle für den Repressor verhindert. Ist aber das Substrat in der Zelle nicht vorhanden, bindet der Repressor an die Bindungsstelle für den Repressor. Die Erhöhung der Expression wird dann durch den anderen Teil des chimären Genprodukts, nämlich den Transaktivierungsfaktor bewirkt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist ein bevorzugtes Regulationssystem das Tetracyclinrepressorsystem, das aus dem Transposon 10 von E.coli her stammt.

In diesem Fall ist das regulierende Substrat Tetracyclin. Sofern Tetracyclin in der Zelle vorhanden ist, erfolgt eine Bindung zwischen Repressor und Tetracyclin und das chimäre Genprodukt kann nicht an den tet-Operator binden. Dadurch wird die Transkription nicht erhöht. Wenn kein Tetracyclin in der Zelle vorhanden ist, kann das Produkt des chimären Gens an den tet-Operator binden und eine Erhöhung der Transkription, die zu einer Steigerung der Expression führt, erfolgt über das VP16-Protein des Herpes Simplex Virus.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Bindungsstelle für den Repressor (b) der

- 6 -

tet-Operator, der in besonders bevorzugter Ausführungsform mehrmals in tandemartiger Anordnung vorhanden ist.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist zwischen dem Transgen (c) und dem Gen kodierend für den Transkriptionsfaktor oder dem chimären Gen (d) eine Internal Ribosome Entry Sequence (IRES) angeordnet, wobei die IRES des Encephalomyocarditis-Virus besonders bevorzugt ist.

In bevorzugter Ausführungsform handelt es sich bei dem Gen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert um ein entsprechendes vom Menschen abstammendes Gen. Als geeignetes Gen für den Transkriptionsfaktor kann das Gen für GATA-1 als Transkriptionsfaktor genannt werden, das an die Bindungssequenz (b) GATA bindet. Dieses Gen ist von Evans et al. in Mol. Cell. Biol., 11 (1991) S. 843-853 beschrieben. Ein anderer geeigneter Transkriptionsfaktor hat die Bezeichnung HNF3 und ist von Hafenrichter et al. in Blood 84 (1994), S. 3394-3404 beschrieben. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an die Bindungssequenz

GCTCCAGGGAATGTTTGTCTTAAATACCATGCT.

Dieses Gen für den Transkriptionsfaktor kann auch Teil eines chimären Gens sein, wobei der andere Teil des chimären Gens für einen Repressor kodiert, der an die Bindungsstelle (b) binden kann. Ein Beispiel für diesen Repressor wäre der Tetracyclinrepressor des Transposons 10 von E. coli oder ein anderer Repressor, der durch ein Medikament, bevorzugt ein Antibiotikum reguliert werden kann. Die Bindungsstelle (b) in dem Nucleinsäurekonstrukt muß dann so gestaltet sein, daß der Transkriptionsfaktor oder das Produkt des chimären Gens an die Bindungsstelle binden kann.

Erfindungsgemäß weisen die Nucleinsäurekonstrukte einen wirtszellverwandten, konstitutiv aktiven Promotor ("housekeeping-promotor") auf, der entweder von dem Wirt

- 7 -

selbst oder einer nah verwandten Spezies stammt. Bevorzugt handelt es sich bei dem wirtszellverwandten Promotor um den menschlichen β -Actinpromotor.

Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist, daß der Teil des chimären Gens (d), der für einen Repressor kodiert, der an die Bindungsstelle (b) binden kann, der Tetracyclinrepressor des Transposon 10 von E.coli ist. Hieran fusioniert ist bevorzugt der Teil eines Gens, der für einen Transaktivierungsfaktor kodiert, wie beispielsweise das VP16-Protein des Herpes Simplex Virus.

In der Regel sind die einzelnen Komponenten (a), (b), (c) und (d) in 5'- zu 3'-Richtung auf dem Polynucleotid angeordnet.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukten handelt es sich in der Regel um nackte transfizierbare DNA oder um Plasmidvektoren. Besonders vorteilhaft bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukten ist, daß eine Expression in den Wirtszellen erreichbar ist, auch wenn die Konstrukte nicht in Form eines viralen, insbesondere retroviralen Vektors vorliegen. Der Einsatz von viralen Vektoren ist bei der Gentherapie aufgrund der unvorhersehbaren Risiken weniger bevorzugt.

Verwendet werden können die Vektoren oder auch entsprechende Nucleinsäurekonstrukte ohne Replikationsursprung zur Transformation einer eukaryotischen Wirtszelle, insbesondere von humanen Zellen wie Blutstammzellen.

Durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte kann die Expression eines in die Zelle eingeführten Fremdgenes über lange Zeit beibehalten werden, da keine Abschaltung der Expression durch die Wirtszelle erfolgt. Die vorliegende Erfindung wird durch die anliegenden Figuren näher erläutert:

- 8 -

Figur 1 A zeigt schematisch monocistronische G-CSF Expressionskonstrukte. Alle Plasmide beruhen auf pBluescript. β -Actin stellt den Promotor des menschlichen β -Actingens dar. CMV stellt den Immediate-Early Promotor von CMV (Cytomegalievirus) dar. G-CSF stellt menschliche G-CSF cDNA dar. TATA bedeutet die TATA-Box. polyA bedeutet das kleine Intron und Polyadenylierungssignal des Virus SV40. tetO bedeutet Tandem-tet-Operatoren. Durch Insertion von tetO Trimeren bei den angegebenen Positionen im Verhältnis zu der TATA box in pBAC.GCSF wurden die Konstrukte pBACP1.GCSF, pBACP2.GCSF und pBACX.GCSF erzeugt.

Figur 1 B stellt einen Vergleich der Einfügungsstellen der tet-Operatorsequenzen innerhalb des menschlichen β -Actinpromotors dar. Die tetO Trimere wurden bei den in Figur 1 A angegebenen Restriktionsstellen eingesetzt. Die entsprechenden Expressionskonstrukte wurden transient in KMST-6 Zellen exprimiert. G-CSF-Konzentrationen in den Überständen wurden 48 Stunden nach Transfektion durch ELISA-Test gemessen.

Figur 2 stellt eine schematische Darstellung der dicistronischen Konstrukte dar. Alle Plasmide beruhen auf pBluescript. Die Abkürzungen haben die oben angegebene Bedeutung. IRES bedeutet Internal Ribosome Entry Sequence (des Encephalomyocarditis-Virus) und tetR/VP16 bedeutet chimärer Transkriptionsaktivator mit dem tet-Repressor und der VP16-Aktivität.

Figur 3 zeigt die Kinetiken von Tetracyclin-induzierter Aktivierung und Repression der G-CSF-Produktion in Balb 3T3 Klonen, die stabil transfiziert wurden mit ptetOtata.GCSF.iresTTAS (ein Klon) und pBACP2.GCSF.iresTTA (zwei Klone). Die Zellen wurden eine Woche ohne (tet⁻ Zellen) und mit (tet⁺ Zellen) 0,1 μ g/ml Tetracyclin kultiviert. Am Tag 0 wurden die Zellen parallel in Zellkulturflaschen ausgesät. An jedem der Tage 0, 1, 2, 3 und 4 wurde das Medium von einem Aliquot der tet⁺ Zellen ersetzt durch Medium ohne tet (Off-On-Kinetik) und das

Medium von einem Aliquot der tet⁻-Zellen wurde ersetzt durch Medium, das 0,1 µg/ml Tetracyclin enthielt (On-Off-Kinetik). Die entsprechenden Medien wurden am Tag 4 erneuert und G-CSF-Konzentrationen in den Überständen wurden am Tag 5 durch ELISA gemessen. Auf die Unterschiede in den G-CSF-Skalen der Figuren darf hingewiesen werden.

Figur 4 zeigt Tabelle 1, die einen Vergleich der verschiedenen Promotoren bei transienter Expression von G-CSF in KMST-6 Zellen ermöglicht. Ein Expressionsplasmid für tetR/VP16 (pUHD 15-1) oder ein Kontrollplasmid (pSP65) wurde durch kationische Lipofektion kotransfiziert mit dem angegebenen G-CSF-Plasmid in einem 1:1 (Gewicht/Gewicht)-Verhältnis. Die G-CSF-Konzentrationen in dem Kulturüberständen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 0,1 µg/ml Tetracyclin 48 Stunden nach Transfektion mit ELISA gemessen. Die angegebenen Werte entsprechen Durchschnittswerten von neuen Bestimmungen in ng/ml (\pm Standardabweichung).

Figur 5 zeigt Tabelle 2, die einen Vergleich der verschiedenen Konstrukte bei transienter Expression von G-CSF in KMST-6 Zellen ermöglicht. Equimolare Mengen der Plasmide wurden durch kationische Lipofektion transfiziert. Geeignete Mengen des Kontrollplasmids (pSP65) wurden zugegeben zu pBAC.GCSF und pCMV.GCSF, um sicherzustellen, daß entsprechende DNA-Mengen in jedem Transfektionskomplex vorhanden waren. Die G-CSF-Konzentrationen in den Kulturüberständen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 0,1 µg/ml Tetracyclin wurden 48 Stunden nach Transfektion mit ELISA-Technik gemessen. Die Werte entsprechen Durchschnittswerten von neuen Bestimmungen in ng/ml (\pm Standardabweichung).

Figur 6 zeigt Tabelle 3, die einen Vergleich der verschiedenen Konstruktionen für die stabile Expression von G-CSF in Balb3T3-Zellen ermöglicht. Ein Expressionsplasmid für Neo^r (placOSTHNeo) wurde durch kationische Lipofektion kotransfiziert mit dem angegebenen G-CSF-Plasmid in einem

- 10 -

1:9 Verhältnis. Stabil transfizierte Zellen wurden durch Zugabe von 1 mg/ml G418 zu dem Kulturmedium selektioniert. Individuelle Kolonien wurden isoliert und expandiert. G-CSF-Konzentrationen von sieben unabhängigen Klonen für jedes G-CSF-Expressionsplasmid wurden gemessen in definierten Kulturüberständen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 0,1 µg/ml Tetracyclin. Die Werte stellen Mittelwerte in $\text{ng}/10^6$ Zellen \times 24 Stunden (\pm Standardabweichung) dar. Statistisch signifikante Unterschiede wurden durch den Wilcoxon's Rank Sum Test zwischen den mit Index markierten Werten festgestellt. Die entsprechenden p-Werte waren $^1p < 0,001$, $^2p < 0,05$, $^3p < 0,01$.

Figur 7 zeigt einen Vergleich der Expression eines erfindungsgemäßen Vektors (dargestellt durch ausgefüllte Kreise) im Verhältnis zu einem entsprechenden Vergleichskonstrukt (offene Kreise). Durch das erfindungsgemäße Nucleinsäurekonstrukt wird rekombinantes humanes G-CSF in Mäusen exprimiert und das Ausmaß der Expression wird gemessen durch den Anstieg der Leukozyten.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Bereitstellung der Ausgangsmaterialien

Der menschliche β -Aktinpromotor wurde von einem Plasmid übernommen, das den β -Aktinpromotor in einem 2,9 kb Sal I - Sac I Fragment enthielt. Die für G-CSF kodierende cDNA wurde durch RT-PCR-Amplifikation von RNA gewonnen, die von Lipopolysaccharid-stimulierten peripheren mononucleären Blutzellen extrahiert wurde (die Plasmide pUHD 15-1 und pUHC 13-3 wurden hergestellt gemäß Gossen und Bujard (PNAS [1992], S. 5547-5551). Die IRES-Sequenz von Encephalomyocarditis-Virus ist beispielsweise in Zimmermann et al. (Virology [1994], S. 366-372) beschrieben.

- 11 -

Die Mäuse Balb3T3-Fibroblasten wurden von der ATCC erhalten. Die immortalisierten menschlichen Fibroblasten Zelllinien KMST-6 wurde von Namba et al. beschrieben (Int.J.Cancer [1985], S. 275-280). Die Zelllinien wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium mit hohem Glucosegehalt kultiviert, das mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 2 mM Natriumpyruvat und 50 µg/ml Gentamycin ergänzt wurde.

Für die Transfektionen wurden die Plasmide durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Verbleibende Kontaminierungen mit Endotoxin wurden durch Behandlung mit Polymyxin B entfernt. Für eine Standardtransfektion wurden 10^5 Zellen in 35 mm Platten ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden 2 µg Plasmid DNA komplexiert mit 6 µl des kationischen Lipofektionsmittels DOSPA/DOPE zu den Zellen zugegeben, und zwar unter serumfreien Bedingungen für 30 Minuten. Für stabile Transfektionsexperimente wurden die Plasmide linearisiert durch Schnitt mit dem Restriktionsenzym Sca I. Eine Mischung von 1,8 µg des Testplasmids und 0,2 µg von placOSTHNeo wurden in dem Lipofektionskomplex zusammengegeben. Um stabile transfizierte Zellen zu selektieren, wurde G418 von Gibco zum Kulturmedium 48 Stunden nach Transfektion zugegeben, wobei für die KMST-6 Zellen 0,5 µg/ml und für die Balb3T3-Zellen 1 µg/ml eingesetzt wurde.

Die Bestimmung der G-CSF-Konzentrationen in den Kulturüberständen wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen ELISA-Tests durchgeführt. Bei transienten Expressionsexperimenten wurden die Überstände 48 Stunden nach Transfektion gesammelt. Um definierte Überstände der stabil transfizierten Klone zu erzeugen, wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 48 Stunden wurde das Medium vollständig erneuert und nach weiteren 24 Stunden gesammelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen trypsinisiert und gezählt. Der Wilcoxon's Rank Sum Test wurde für die statistische Analyse verwendet.

- 12 -

Menschliches G-CSF war in Überständen von nicht transfizierten KMST- und Balb3T3-Zellen nicht nachweisbar.

Beispiel 2

Das Plasmid pCMV.GCSF, dargestellt in Figur 1 A beruht auf pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, CA) und enthält die menschliche G-CSF cDNA unter der Kontrolle des Immediate/Early Promotors von CMV und ein Polyadenylierungssignal, das von SV40 stammt. Der CMV-Promotor (Kontrolle) wurde ersetzt durch den menschlichen β -Aktin-Promotor (erfindungsgemäß) oder den minimalen Promotor mit tetO, um p β AC.GCSF und ptetOtata.GCSF zu erhalten. Mit Hilfe einer zweischrittigen PCR-Technologie wurde das 11. ATG Kodon der EMCV IRES von pSport/PV/2/5'-Aat fusioniert an das Translationsinitiationskodon der tetR/VP16 cDNA von pUHD 15-1. Alle mit Hilfe der PCR-Technologie erzeugten Fragmente wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Beispiel 3

In einer ersten Experimentserie wurde versucht, eine Stelle innerhalb des menschlichen β -Aktin-Promotors zu identifizieren, die eine Insertion des tet-Operators (tetO) ermöglichen würde, ohne die Grundpromotoraktivität wesentlich zu beeinträchtigen. Tandem tetO Sequenzen wurden durch PCR-Amplifikation des tetO Heptamers aus dem Plasmid pUHC 13-3 mit tetO-spezifischen Primern erhalten, wobei Pst I oder Xho I Restriktionsstellen an beiden Enden der PCR-Produkte zugefügt wurden. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigte eine Leiter von tetO-Concatameren. tetO-Trimere wurden aus dem Gel ausgeschnitten und an den Pst I-Stellen an Position -423 und -1663 bezüglich der TATA Box oder an einer Xho I-Stelle an Position -23 eingesetzt. Diese modifizierten Promotoren wurden dann in p β AC.GCSF kloniert anstelle des unmodifizierten β -Aktin-Promotors. Dies ist in Figur 1 A gezeigt. Die transiente Expression dieser Plasmide in KMST-

- 13 -

6 Zellen identifizierte die Insertion des tetO-Trimers an der Pst I-Stelle an Position -423 (p β ACP2.GCSF) als eine Anordnung, die 85 % der grundlegenden Promotoraktivität beibehielt. Dies ist in Figur 1 B gezeigt. Insertionen an anderen Stellen oder die Verwendung von tetO-Hexameren führte zu einer wenigstens 65 %igen Reduktion der Promotoraktivität (Figur 1 B).

Beispiel 4

Um die Funktion der tetO-Sequenzen innerhalb des β -Aktin-Promotors von p β ACP2.GCSF zu testen wurden Kotransfektionsexperimente von G-CSF-Expressionskonstrukten zusammen mit einem Expressionskonstrukt für tetR/VP16 (pUHD 15-1) in KMST-6 Zellen durchgeführt. G-CSF-Expressionsniveaus von p β AC.GCSF (kein tet-Operator) entsprachen in etwa dem Niveau, wenn entweder pUHD 15-1 oder ein Kontrollplasmid (pSP65) kotransfiziert wurden, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Tetracyclin (tet) in dem Kulturmedium. Dies ist in der Tabelle 1 der Figur 4 gezeigt. Im Gegensatz dazu ergab die Koexpression von tetR/VP16 in Abwesenheit von Tetracyclin eine 3-4-fach höhere Expression von G-CSF von dem modifizierten β -Aktin-Promotor in p β ACP2.GCSF. Zugabe von 0,1 μ g/ml Tetracyclin zu dem Kulturmedium oder Kotransfektion von pSP65 anstelle von pUHD 15-1 reduzierte die GCSF-Expression von p β ACP2.GCSF auf ein Niveau, das vergleichbar ist mit p β AC.GCSF. Der tetR/VP16 induzierte tetO modifizierte β -Aktin-Promotor war auch stärker als der voll induzierte minimale tetO-Promotor pCMV*-1. Dieses Konstrukt entspricht ptetOtata.GCSF, dargestellt in Figur 1 A. Die Ergebnisse bestätigen die Funktion der tetO-Sequenzen innerhalb des β -Aktin-Promotors und zeigen deutlich die Fähigkeit des tetR/VP16-Systems der transkriptionellen Regulation in den erfindungsgemäß verwendeten Zelllinien. Alle diese Promotoren führten jedoch zu einer deutlich geringeren Expression verglichen mit dem starken Immediate-Early-CMV-Promotor in pCMV.GCSF. In Balb3T3-Zellen wurden entsprechende Ergebnisse erhalten.

Beispiel 5

Nachdem eine optimale Promotoranordnung festgestellt wurde, wurden dicistronische Expressionsplasmide für die gleichzeitige Expression eines therapeutischen Gens und tetR/VP16 konstruiert. Das Translation-Initiations-Kodon der tetR/VP16 cDNA wurde fusioniert an das 11. ATG Kodon von EMCV in einem zweischrittigen PCR-Verfahren und die erhaltene IRES-tetR/VP16-Sequenz wurde eingesetzt stromabwärts von der G-CSF cDNA in pBAC.GCSF, pBACP2.GCSF und ptetOtata.GCSF. Dies ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 6

Der dicistronische Vektor wurde verglichen mit dem monocistronischen G-CSF-Expressionsplasmid in transienten Expressionsexperimenten in KMST-6 Zellen. Um dieses Experiment zu standardisieren in bezug auf den Unterschied in der Größe des Expressionsvektors wurde pCMV.GCSF und pBAC.GCSF mit geeigneten Mengen von pSP65 gemischt, um equimolare Verhältnisse des Expressionsvektors innerhalb der 2 µg DNA aufrechtzuerhalten, die für Standardtransfektionskomplexe verwendet wurden. In diesem normalisierten Experiment war der CMV-Promotor etwa dreimal stärker als der Wildtyp β-Actin-Promotor. Dies ist in der Tabelle 2 von Figur 5 gezeigt. Die Feedback-Transkriptionsaktivator-Anordnung mit dem tetO-modifizierten β-Actin-Promotor (pBACP2.GCSF.iresTTA) führte zu sogar höheren Expressionsniveaus verglichen mit dem starken CMV-Promotor. Im Gegensatz zu den Kotransfektionsexperimenten mit monocistronischen Vektoren (Tabelle 1) wurde die Transkription von pBACP2.GCSF.iresTTA nur teilweise inhibiert durch die Zugabe von Tetracyclin.

Zusätzlich zu der transienten Expression wurden auch die Expressionsniveaus des Feedback aktivierenden Vektors nach Integration in das zelluläre Genom untersucht. Balb3T3-Zellen wurden kotransfiziert mit einem der dicistronischen

- 15 -

Plasmide und placOSTHNeo. Individuelle Neomycin-resistente Kolonien wurden isoliert und expandiert und definierte Überstände wurden auf die Produktion von G-CSF untersucht. Dies ist in Tabelle 3 von Figur 6 gezeigt. Das tetO - ires-tetR/VP16 Arrangement führte zu einer mittleren dreifachen Erhöhung der G-CSF-Produktion verglichen mit dem konventionellen β -Actin-Promotor ($p < 0,001$). Diese Erhöhung wurde teilweise inhibiert durch Tetracyclin, wenn dieses während der Subkultivierung der Zellen für die Sammlung der definierten Überstände vorhanden war. Die Koexpression von tetR/VP16 von einem Wildtyp β -Actin-Promotor (p β AC.GCSF.iresTTA) führte zu einer vorübergehenden, aber auch variablen Expression, die statistisch unterschiedlich war von p β ACP2.GCSF.iresTTA ($p < 0,01$) und p β AC.GCSF ($p < 0,05$) unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Tetracyclin. Die stärkste Produktion von G-CSF wurde in einem p β ACP2.GCSF.iresTTA-transfizierten KMST-6 Klon gemessen und belief sich auf 2,4 μ g G-CSF per 10^6 Zellen in 24 Stunden.

Beispiel 7

Zusätzlich zu diesen konstitutiv aktiven Promotoren wurde ein analoges Expressionsplasmid basierend auf dem minimalen tetR/PV16-induzierbaren Promotor untersucht (ptetOtata.GCSF.iresTTA) (gezeigt in Figur 2). In stabilen Transfektionsexperimenten mit beiden Zelllinien wurde eine durchschnittliche Produktion von G-CSF in Abwesenheit von Tetracyclin gefunden, und zwar mehr als zwei Größenordnungen unter dem Feedback-Konstrukt mit dem modifizierten β -Actin-Promotor. Dies ist in Tabelle 3 gezeigt. Die Transgenexpression war also hochvariabel zwischen individuellen, mit ptetOtata.GCSF.iresTTA transfizierten Klonen.

Um das volle regulatorische Potential von Tetracyclin für die G-CSF-Expression von p β ACP2.GCSF.iresTTA und ptetOtata.GCSF.iresTTA zu untersuchen, wurden die "On-Off"- und "Off-On"-Kinetiken studiert in repräsentativen Balb3T3-Klonen mit einer hohen Produktion von G-CSF für das

- 16 -

entsprechende Plasmid. Dies ist in Figur 3 dargestellt. In beiden Fällen wurden maximale und minimale Expressionsniveaus fünf Tage nach Entfernung oder Zugabe von Tetracyclin erhalten. Während das minimale Promotorplasmid die Regulation von G-CSF um den Faktor fünf ermöglichte, konnte der modifizierte β -Actin-Promotor nur um ungefähr 40 % reprimiert werden.

Beispiel 8

Nachweis der längerfristigen Expression

Um zu belegen, daß durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäurekonstrukte eine längerfristige Expression eines Transgens in vivo ermöglicht wird, wurden die beiden Vektoren p β ACP2tetO.GCSF.i β restTA (erfindungsgemäß) und p β AC.GCSF (Vergleich) miteinander verglichen.

Es wurden Mäuse Balb3T3-Zellen entweder mit dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor p β ACP2tetO.GCSF.i β restTA oder mit dem Vergleichsvektor p β AC.GCSF (ohne Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor und ohne Gen kodierend für einen Transkriptionsfaktor), jeweils in Kombination mit einem Expressionskonstrukt für Neomycin Phosphotransferase durch kationische Lipofektion transfiziert. Stabil transfizierte Klone wurden durch Selektion mit G418 isoliert und anschließend expandiert. Jeweils ein Balb3T3-Klon jedes Plasmids wurde für in vivo-Experimente ausgewählt.

Der mit p β ACP2tet.GCSF.i β restTA transfizierte Balb3T3-Klon produziert als therapeutisches Genprodukt ca. 1,2 μ g rekombinantes humanes G-CSF pro 24 h und 10^6 Zellen. Der mit dem Vergleichskonstrukt (p β AC.GCSF) transfizierte Balb3T3-Klon produziert etwa 0.25 μ g rekombinantes humanes G-CSF pro 24 h und 10^6 Zellen.

Von jedem der beiden Klone wurden 5×10^6 Zellen Mäusen vom SCID-Typ subkutan injiziert. Pro Plasmid bzw. Klon wurden

- 17 -

jeweils 3 Mäuse eingesetzt. Als Maß für die Expression der therapeutischen Gene wurde anschließend die Leukozytenzahl der Mäuse im Verlauf bestimmt.

Wie in Figur 7 dargestellt, führt der Einsatz des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukts pBACP2tetO.GCSF.iRestTA zu einem deutlichen und dauerhaften Anstieg der Leukozyten, während die Verwendung des Vergleichsvektors pBAC.GCSF.iRestTA nur zu einem minimalen und vorübergehenden Anstieg der Leukozyten führte.

Patentansprüche

1) Nucleinsäurekonstrukt, das zur Expression eines Fremdgens in einer Wirtszelle geeignet ist, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Komponenten aufweist:

- (a) wenigstens einen Teil eines Promotors, der einem wirtsverwandten, konstitutiv aktiven Promotor entspricht,
- (b) wenigstens eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor,
- (c) wenigstens ein Transgen und
- (d) wenigstens ein Gen kodierend für einen Transkriptionsfaktor, der an die Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor (b) binden kann.

2) Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen kodierend für einen Transkriptionsfaktor (d) ausgewählt ist unter dem GATA-1 Transkriptionsfaktor und dem Transkriptionsfaktor HNF3.

3) Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor (b) um die Bindungsstelle für einen Repressor handelt und, daß es sich bei dem Gen kodierend für den Transkriptionsfaktor (d) um ein chimäres Gen kodierend für einen Repressor handelt, der an die Bindungsstelle für einen Repressor (b) binden kann, fusioniert mit wenigstens einem Teil eines Transaktivierungsfaktors.

4) Nucleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstelle für einen Repressor (b) der tet-Operator ist.

5) Nucleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor (b) mehrmals in tandemartiger Anordnung vorhanden ist.

6) Nucleinsäurekonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Transgen (c) und dem Gen kodierend für den Transkriptionsfaktor (d) eine Internal Ribosome Entry Sequence (IRES) angeordnet ist.

7) Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Internal Ribosome Entry Sequence um die IRES des Encephalomyocarditis-Virus handelt.

8) Nucleinsäurekonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem wirtszellverwandten, konstitutiv aktiven Promotor (a) um den menschlichen β -Actinpromotor handelt.

9) Nucleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil des chimären Gens (d), der für einen Repressor kodiert, der an die Bindungsstelle (b) binden kann, der Tetracyclinrepressor des Transposon 10 von E.coli ist.

10) Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil des chimären Gens, der für einen Transaktivierungsfaktor kodiert, das VP16-Protein des Herpes Simplex Virus ist.

11) Nucleinsäurekonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen

Komponenten (a), (b), (c) und (d) in 5'- zu 3'-Richtung angeordnet sind.

12) Nucleinsäurekonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Vektor handelt.

13) Nucleinsäurekonstrukt nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Plasmidvektor handelt.

14) Verwendung eines Nucleinsäurekonstrukts nach einem der Ansprüche 1-13 zur Transformation einer eukaryotischen Wirtszelle.

1/7

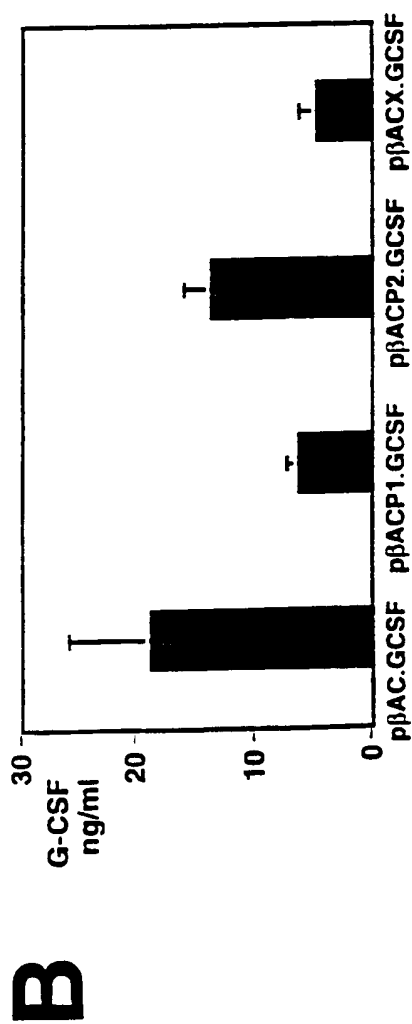
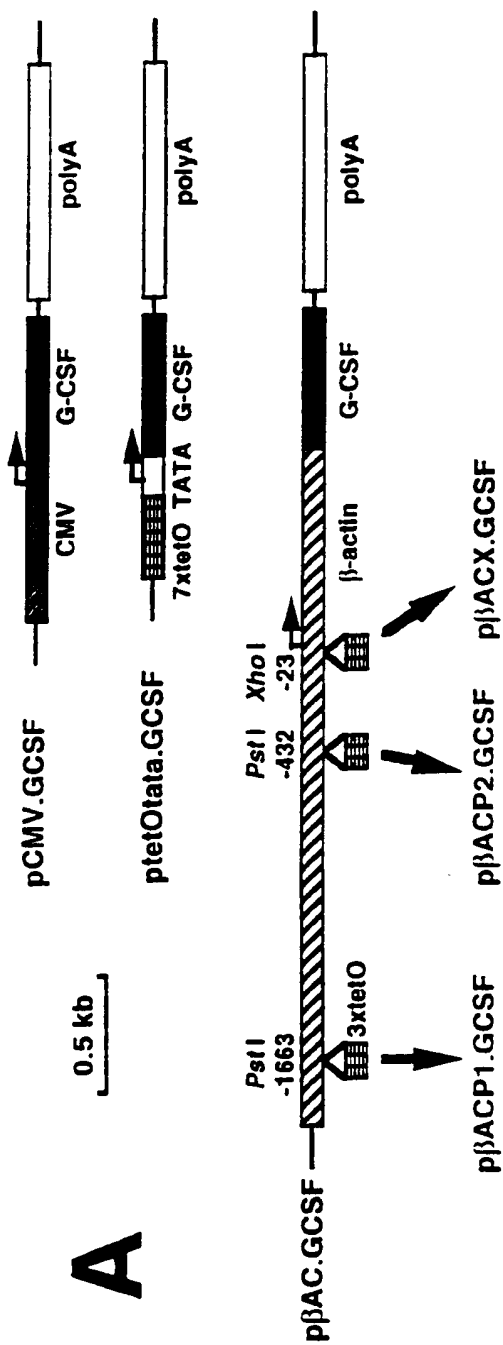


Fig. 1

2/7

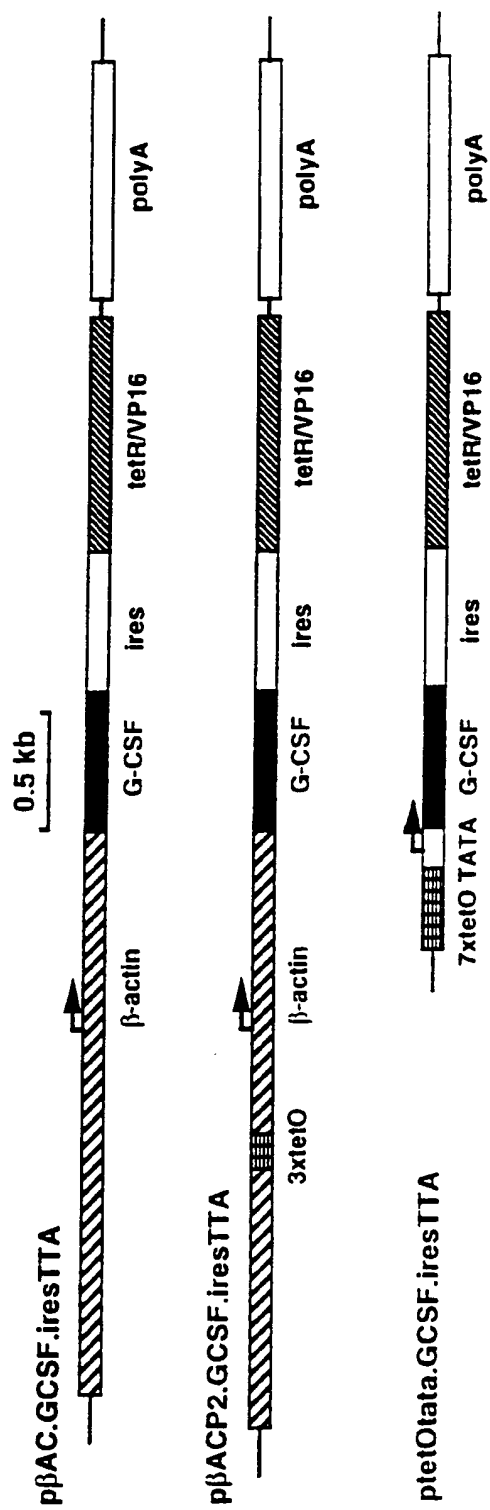


Fig. 2

3/7

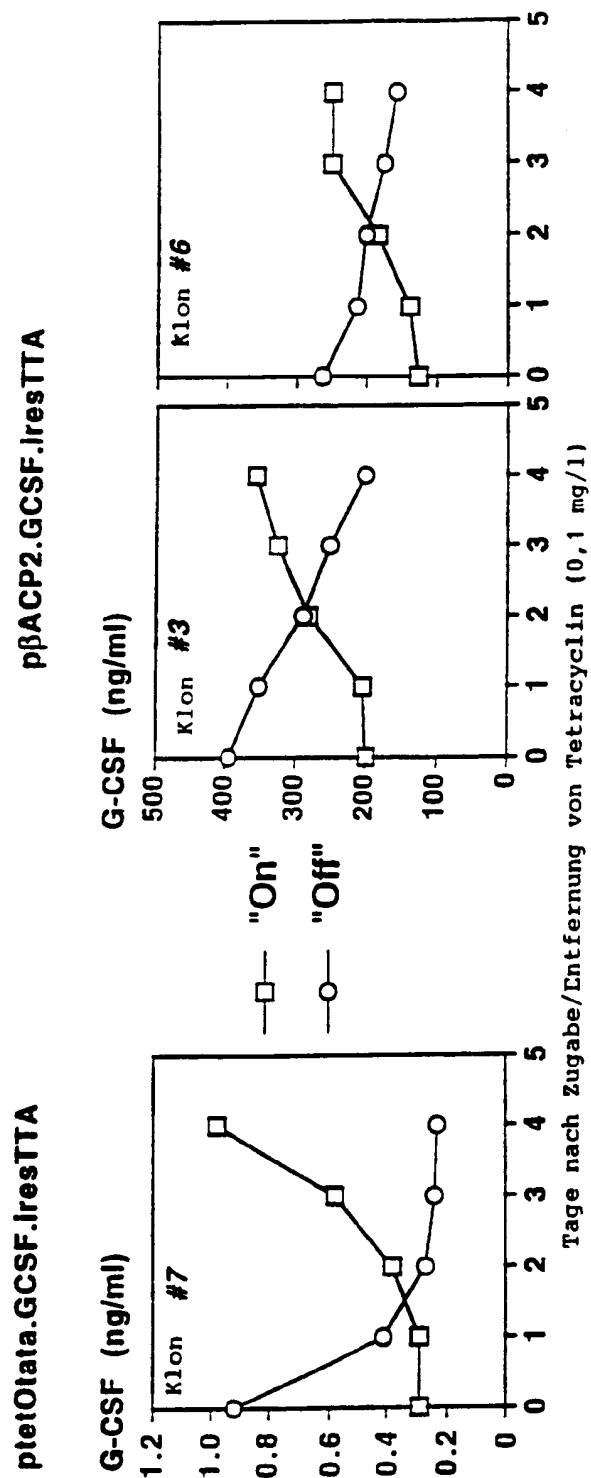


Fig. 3

4/7

Tabelle 1

G-CSF-Plasmid	pβAC.GCSF	pβACP2.GCSF	pCMV.GCSF	pIetO _{total} .GCSF				
Co-transfection:	pUHD 15-1 pSP65	pUID15-1 pSP65	pUHD15-1 pSP65	pUHD15-1 pSP65				
- tet	8.8 (±1.6)	8.1 (±2.6)	26.1 (±2.8)	6.8 (±1.3)	59.1 (±12.4)	79.8 (±7.6)	19.8 (±4.5)	0.25 (±0.04)
+ tet	8.4 (±1.8)	7.8 (±0.6)	7.9 (±0.9)	6.7 (±0.6)	48.5 (±6.7)	77.7 (±8.5)	0.17 (±0.02)	0.17 (±0.02)

Fig. 4

Tabelle 2

Plasmid	p β AC.GCSF	p β ACP2.GCSF.iresTTA	pCMV.GCSF
- tet	28.7 (\pm 3.0)	122.8 (\pm 14.9)	80.5 (\pm 9.7)
+ tet	29.6 (\pm 2.2)	80.1 (\pm 5.1)	82.0 (\pm 6.9)

Fig. 5

6/7

Tabelle 3

Plasmid	p β AC.GCSF	p β AC.GCSF.i-resTTA	p β ACP2.GCSF.i-resTTA	ptetOtata.GCSF.i-resTTA
- tet	139.0 (\pm 59.0) ^{1,2}	329.0 (\pm 229.0) ^{1,2}	1420 (\pm 696) ^{1,3}	7.1 (\pm 13.6)
+ tet	110.0 (\pm 62.0)	343.0 (\pm 250.0)	1142 (\pm 432)	4.4 (\pm 6.0)

Fig. 6

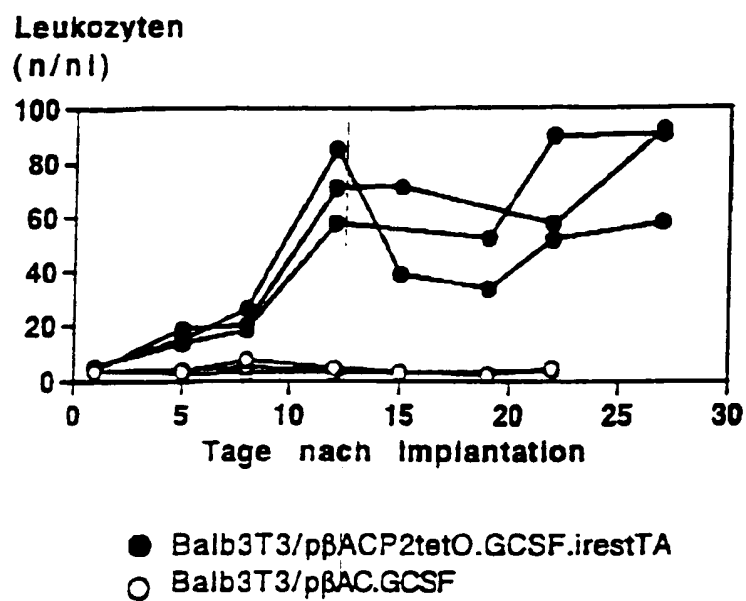


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 98/00992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/79 C12N15/85 C12N15/67

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 29442 A (BASF AG) 22 December 1994 * Pages 1-6; Page 26, Lines 7-34; Claims *	1-4, 8-14
Y	WO 96 33272 A (KLINIKUM DER ALBERT - LUDWIGS- UNIVERSITÄT FREIBURG) 24 October 1996 * Page 4; Claims; Abb. 1-3 *	1-14
Y	WO 96 01313 A (BUJARD, H. & GOSSEN, M.) 18 January 1996 * Abstract; Pages 2-45; Claims *	1-14
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 July 1998

Date of mailing of the international search report

04/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hermann, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/00992

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	<p>HOFMANN, A. ET AL.: "Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 93, 1996, pages 5185-5190, XP002070633 cited in the application</p> <p>* document * -----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/00992

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429442	A	22-12-1994	AU 684524 B	18-12-1997
			AU 7108194 A	03-01-1995
			CA 2165162 A	22-12-1994
			EP 0705334 A	10-04-1996
			JP 9500526 T	21-01-1997
			US 5650298 A	22-07-1997
			US 5589362 A	31-12-1996
WO 9633272	A	24-10-1996	DE 19514310 A	24-10-1996
			AU 5331796 A	07-11-1996
WO 9601313	A	18-01-1996	US 5654168 A	05-08-1997
			AU 3092395 A	25-01-1996
			CA 2193122 A	18-01-1996
			CN 1167504 A	10-12-1997
			EP 0804565 A	05-11-1997
			FI 965287 A	28-02-1997
			NO 965623 A	28-02-1997
			US 5589362 A	31-12-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00992

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/79 C12N15/85 C12N15/67

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 29442 A (BASF AG) 22.Dezember 1994 * Seiten 1-6; Seite 26, Zeilen 7-34; Ansprüche *	1-4, 8-14
Y	WO 96 33272 A (KLINIKUM DER ALBERT - LUDWIGS- UNIVERSITÄT FREIBURG) 24.Oktober 1996 * Seite 4; Ansprüche; Abb. 1-3 *	1-14
Y	WO 96 01313 A (BUJARD, H. & GOSSEN, M.) 18.Januar 1996 * Zusammenfassung; Seiten 2-45; Ansprüche*	1-14
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Juli 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/08/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beardensteller

Hermann, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00992

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
Y	<p>HOFMANN, A. ET AL.: "Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette"</p> <p>PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 93, 1996, Seiten 5185-5190, XP002070633</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>* insgesamt *</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00992

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9429442 A	22-12-1994	AU 684524 B	18-12-1997
		AU 7108194 A	03-01-1995
		CA 2165162 A	22-12-1994
		EP 0705334 A	10-04-1996
		JP 9500526 T	21-01-1997
		US 5650298 A	22-07-1997
		US 5589362 A	31-12-1996
WO 9633272 A	24-10-1996	DE 19514310 A	24-10-1996
		AU 5331796 A	07-11-1996
WO 9601313 A	18-01-1996	US 5654168 A	05-08-1997
		AU 3092395 A	25-01-1996
		CA 2193122 A	18-01-1996
		CN 1167504 A	10-12-1997
		EP 0804565 A	05-11-1997
		FI 965287 A	28-02-1997
		NO 965623 A	28-02-1997
		US 5589362 A	31-12-1996